

BD

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成11年(1999)6月15日

【公開番号】特開平6-116279

【公開日】平成6年(1994)4月26日

【年通号数】公開特許公報6-1163

【出願番号】特願平3-120287

【国際特許分類第6版】

C07F 9/10

【F I】

C07F 9/10 D

【手続補正書】

【提出日】平成5年6月15日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

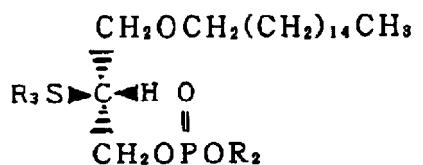
【補正対象項目名】請求項2

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項2】一般式[I I]

【化2】

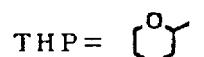
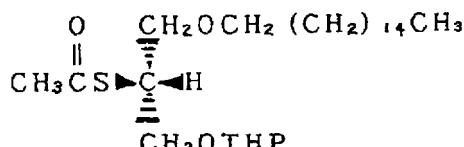


[II]

(式中、R₃はアシル基を示し、R₂は前記と同じ基を示す)で表されるチオPAFおよびチオPAFアシル類縁体化合物を製造する方法において、(S)-1-O-アセチル-2-O-ベンジルグリセロールを出発原料と

し、一般式[I I I]

【化3】



[III]

で表される化合物を経由することを特徴とする一般式[I I]の化合物の製造法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】発明の詳細な説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は新規なエーテル型チオリソルビド化合物である光学活性チオPAFアシル類縁体化合物およびその製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】エーテル型チオリソルビド化合物であるPAF(血小板活性化因子)[1-アルキル-2-アセチル-2-デオキシ-sn-グリセロ-3-ホスフォコリン]

ン]は、広範囲な生理活性を持った強力な脂質のメディエーターである。PAFの2-アセチル基を2-チオアセチル基に変えたチオPAF[1-O-ヘキサデシル-2-チオアセチル-2-デオキシ-sn-グリセロ-3-ホスフォコリン]については報告があるが(Tetrahedron Lett., 28巻, 1729頁(1987))、本発明のエーテル型チオリソルビド化合物である光学活性チオPAFアシル類縁体化合物については全く報告がない。

【0003】

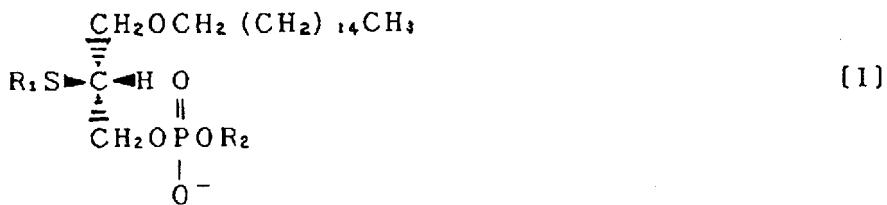
【発明が解決しようとする課題】本発明は、PAFアセチルヒドロラーゼやホスホリパーゼA2活性の測定において基質として有用な新規なエーテル型チオリソルビド化合物である光学活性チオPAFアシル類縁体化合物およびその製造法を提供することを目的とする。

【0004】

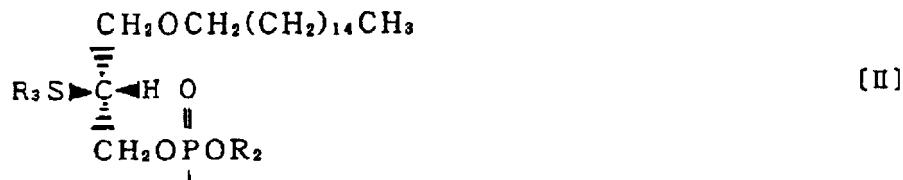
【課題を解決するための手段】本発明は、一般式[I]

【0005】

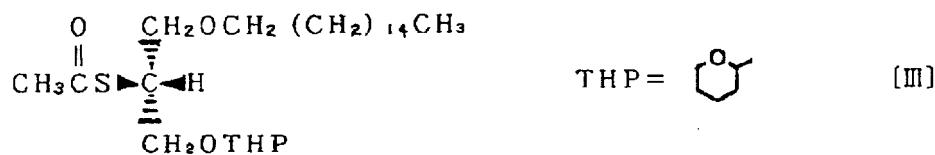
【化4】



【0006】(式中、 R_1 はアセチル基を除くアシル基を示し、 R_2 はトリメチルアミノエチル基、アミノエチル基またはグリセリン基を示す)で表されるチオPAFアシル類縁体化合物にある。また、本発明は、一般式



【0008】(式中、 R_3 はアシル基を示し、 R_2 は前記と同じ基を示す)で表されるチオPAFおよびチオPAFアシル類縁体化合物を製造する方法において、
(S)-1-O-アセチル-2-O-ベンジルグリセロ



【0010】で表される化合物を経由することを特徴とする一般式【I I】の化合物の製造法にある。本発明における一般式【I】の R_1 はアセチル基を除くアシル基を示し、特に炭素数が2から22の飽和または不飽和のアシル基が好ましく、例えば、プロピオニル基、ブチリル基、バレリル基、カブロイル基、ヘプタノイル基、オクタノイル基、ノナノイル基、ラウロイル基、ミリストイル基、パルミトイル基、ステアロイル基、エイコサノイル基、ベヘノイル基、パルミトレイル基、オレオイル基、リノレオイル基、リノレノイル基およびアラキドニル基等が挙げられる。 R_2 はトリメチルアミノエチル基、アミノエチル基またはグリセリン基を示す。

【0011】また、一般式【I I】の R_3 はアシル基を示し、特に炭素数が2から22の飽和または不飽和のアシル基が好ましく、例えば、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、バレリル基、カブロイル基、ヘプタノイル基、オクタノイル基、ノナノイル基、ラウロイル基、ミリストイル基、パルミトイル基、ステアロイル基、エイコサノイル基、ベヘノイル基、パルミトレイル基、オレオイル基、リノレオイル基、リノレノイル基およびアラキドニル基等が挙げられる。 R_2 は前記と同じ基を示す。

【0012】本発明におけるチオPAFおよびチオPA

【I I】

【0007】

【化5】

ールを出発原料とし、一般式【I I I】

【0009】

【化6】

Fアシル類縁体化合物の合成における反応過程の例を図1に示した。なお、図1において、1は(S)-1-O-アセチル-2-O-ベンジルグリセロール、2は(R)-1-O-アセチル-2-O-ベンジル-3-O-トシリグリセロール、3は(R)-2-O-ベンジル-1-O-トシリグリセロール、4は(R)-2-O-ベンジル-3-O-テトラヒドロピラニル-1-O-トシリグリセロール、5は(S)-2-O-ベンジル-3-O-ヘキサデシル-1-O-テトラヒドロピラニルグリセロール、6は(S)-3-O-ヘキサデシル-1-O-テトラヒドロピラニルグリセロール、7は(S)-3-O-ヘキサデシル-2-O-(4-ニトロベンゼンスルホニル)-1-O-テトラヒドロピラニルグリセロール、8aは(R)-1-O-ヘキサデシル-3-O-テトラヒドロピラニル-2-チオアセチル-2-デオキシグリセロール、8bは(R)-1-O-ヘキサデシル-3-O-テトラヒドロピラニル-2-チオオクタノイル-2-デオキシグリセロール、8cは(R)-1-O-ヘキサデシル-3-O-テトラヒドロピラニル-2-チオアラキドニル-2-デオキシグリセロール、9aは1-O-ヘキサデシル-2-チオアセチル-2-デオキシ-s n-グリセロ-3-ホスフォコリン、9bは1-O-ヘキサデシル-2-チオオクタノイル-2-デオキ

1H-NMR δ (CDC13) : 0. 88 (3H, b
r t), 1. 15-1. 35 (28H, m), 1. 4
0-1. 80 (6H, m), 2. 31 (3H, s),
3. 27-4. 30 (9H, m), 4. 61 (1H,
m)

8. (R)-1-O-ヘキサデシル-3-O-テトラヒ
ドロピラニル-2-チオオクタノイル-2-デオキシグ
リセロールの合成

リチウムアルミニウムハイドライド 228 mg を乾燥テ
トラヒドロフラン (30 ml) に懸濁させ、氷冷下、先
に合成した (R)-1-O-ヘキサデシル-3-O-テ
トラヒドロピラニル-2-チオアセチル-2-デオキシグ
リセロール 916 mg の乾燥テトラヒドロフラン (2
0 ml) 溶液を滴下し、室温で2時間攪拌した。反応液
に10%水酸化ナトリウム水溶液を氷冷下加え、過剰の
リチウムアルミニウムハイドライドを分解したのち反応
液を吸引濾過し、濾液を濃縮してチオール体を得た。チ
オール体を乾燥ジクロロメタン (20 ml) に溶解しト
リエチルアミン 202 mg を加え、氷冷下、塩化オクタ
ノイルクロライド 358 mg のジクロロメタン (10 ml)
溶液を滴下し、室温で2時間攪拌した。反応液を水
および飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥
した。シリカゲルクロマトグラフィー (n-ヘキサン: 酢
酸エチル = 10:1) で精製し油状物質の (R)-1-
O-ヘキサデシル-3-O-テトラヒドロピラニル-2
-チオオクタノイル-2-デオキシグリセロール 748
mg (69%) を得た。

【0018】9. (R)-1-O-ヘキサデシル-3-
O-テトラヒドロピラニル-2-チオアラキドニル-2
-デオキシグリセロールの合成

リチウムアルミニウムハイドライド 228 mg を乾燥テ
トラヒドロフラン (30 ml) に懸濁させ、氷冷下、先
に合成した (R)-1-O-ヘキサデシル-3-O-テ
トラヒドロピラニル-2-チオアセチル-2-デオキシグ
リセロール 916 mg の乾燥テトラヒドロフラン (2
0 ml) 溶液を滴下し、室温で2時間攪拌した。反応液
に10%水酸化ナトリウム水溶液を氷冷下加え、過剰の
リチウムアルミニウムハイドライドを分解したのち反応
液を吸引濾過し、濾液を濃縮してチオール体を得た。次
にこのチオール体とアラキドン酸 152 mg の乾燥ジメ
チルホルムアミド (20 ml) 溶液に、氷冷下ジエチル
ホスフォロシアニデート 652 mg を滴下し、さらにト
リエチルアミン 404 mg を滴下し、室温で一夜攪拌
した。反応液に水 (100 ml) を加え、ジエチルエーテ
ル (20 ml) で3回抽出し、有機層を合わせ、飽和食
塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した。シリカゲ
ルクロマトグラフィー (n-ヘキサン: 酢酸エチル = 1
0:1) で精製し油状物質の (R)-1-O-ヘキサデ
シル-3-O-テトラヒドロピラニル-2-チオアラキ
ドニル-2-デオキシグリセロール 1. 22 g (87

%) を得た。

【0019】10. 1-O-ヘキサデシル-2-チオア
セチル-2-デオキシ-sn-グリセロ-3-ホスフォ
コリンの合成

先に合成した (R)-1-O-ヘキサデシル-3-O-
テトラヒドロピラニル-2-チオアセチル-2-デオキ
シグリセロール 1 mmol のエタノール (50 ml) 溶
液に、ピリジニウムバラトルエンスルホン酸 25 mg を
加え 55°C で一夜攪拌した。エタノールを留去し、残
渣にエーテル (50 ml) を加え、水および飽和食塩水
で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。エーテル
を留去しアルコール体を得た。次に 2-ブロモエチルホ
スフォロジクロリデート 390 mg とトリエチルアミン
370 mg のジクロロメタン (30 ml) 混合溶液に、
氷冷下、上記のアルコール体のジクロロメタン (10 ml)
溶液を滴下し、一夜攪拌した。反応液を水および飽
和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、ジクロ
ロメタンを留去してホスフォリレートを得た。これにト
リメチルアミンを含んだクロロホルム溶液を加え、封管
中 65°C で一夜攪拌した。反応液を濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (クロロホルム: メタノール: 水 = 65:25:4) に付し 1-O-ヘキサデシル-2-チオアセチル-2-デオキシ-sn-グリセロ-3-ホスフォコリンを得た。

収量 302 mg、収率 56%

[α] D -6. 1° (C=0. 91, CHCl3 : MeOH = 4:1)

FABMASS: m/z (M+H) + 540

IR (neat): 1690 (チオエステル)

1H-NMR δ (CDC13) : 0. 88 (3H, b
r t), 1. 26 (28H, s), 2. 34 (3H,
s), 3. 32 (9H, s), 3. 45-4. 30 (1
H, m)

11. 1-O-ヘキサデシル-2-チオオクタノイル-
2-デオキシ-sn-グリセロ-3-ホスフォコリンの
合成

先に合成した (R)-1-O-ヘキサデシル-3-O-
テトラヒドロピラニル-2-チオオクタノイル-2-デ
オキシグリセロール 1 mmol のエタノール (50 ml)
溶液に、ピリジニウムバラトルエンスルホン酸 25
mg を加え 55°C で一夜攪拌した。エタノールを留去
し、残渣にエーテル (50 ml) を加え、水および飽和食
塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。エ
ーテルを留去しアルコール体を得た。次に 2-ブロモエ
チルホスフォロジクロリデート 390 mg とトリエチル
アミン 370 mg のジクロロメタン (30 ml) 混合溶
液に、氷冷下、上記のアルコール体のジクロロメタン
(10 ml) 溶液を滴下し、一夜攪拌した。反応液を水
および飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥
し、ジクロロメタンを留去してホスフォリレートを得

た。これにトリメチルアミンを含んだクロロホルム溶液を加え、封管中65°Cで一夜攪拌した。反応液を濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール：水=65:25:4）に付し1-O-ヘキサデシル-2-チオオクタノイル-2-デオキシ-sn-グリセロ-3-ホスフォコリンを得た。

収量330mg、収率53%

[α]D -2.7° (C=1.74, CHCl₃:MeOH=4:1)

FABMASS: m/z (M+H) + 624

IR (neat) : 1690 (チオエステル) 1H-N

MR δ (CDCl₃) : 0.88 (6H, br t), 1.26 (3

8H, s), 2.52-2.57 (2H, m), 3.4

3 (9H, s), 3.59-4.46 (11H, m)

12.1-O-ヘキサデシル-2-チオアラキドニル-2-デオキシ-sn-グリセロ-3-ホスフォコリンの合成

先に合成した(R)-1-O-ヘキサデシル-3-O-テトラヒドロピラニル-2-チオアラキドニル-2-デオキシグリセロール1mmolのエタノール(50mL)溶液に、ピリジニウムパラトルエンスルホン酸25mgを加え55°Cで一夜攪拌した。エタノールを留去し、残渣にエーテル(50mL)を加え、水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。エーテルを留去しアルコール体を得た。次に2-プロモエチルホスフォロジクロリデート390mgとトリエチルアミン370mgのジクロロメタン(30mL)混合溶

液に、氷冷下、上記のアルコール体のジクロロメタン(10mL)溶液を滴下し、一夜攪拌した。反応液を水および飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、ジクロロメタンを留去してホスフォリレートを得た。これにトリメチルアミンを含んだクロロホルム溶液を加え、封管中65°Cで一夜攪拌した。反応液を濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール：水=65:25:4）に付し1-O-ヘキサデシル-2-チオアラキドニル-2-デオキシ-sn-グリセロ-3-ホスフォコリンを得た。

収量431mg、収率55%

[α]D -2.8° (C=2.45, CHCl₃:MeOH=4:1)

FABMASS: m/z (M+H) + 785

IR (neat) : 1690 (チオエステル)

1H-NMR δ (CDCl₃) : 0.85-0.91 (6H, m), 1.26 (36H, m), 2.01-2.13 (4H, m), 2.53-2.58 (2H, m), 2.78-2.86 (6H, m), 3.42 (9H, s), 3.35-4.36 (11H, m), 5.26-5.45 (8H, m)

【0020】

【発明の効果】本発明により新規なエーテル型チオリン脂質化合物である光学活性チオPAFアシル類縁体化合物およびその製造法が提供された。そして、この新規なチオPAFアシル類縁体化合物はPAFアセチルヒドロラーゼやホスホリバーゼA2活性の測定において基質として有用である。

【手続補正書】

【提出日】平成10年3月30日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正内容】

【0010】で表される化合物を経由することを特徴とする一般式【II】の化合物の製造法にある。本発明における一般式【I】のR₁はアセチル基を除くアシル基

を示し、特に炭素数が3から22の飽和または不飽和のアシル基が好ましく、例えば、プロピオニル基、ブチリル基、バレリル基、カブロイル基、ヘプタノイル基、オクタノイル基、ノナノイル基、ラウロイル基、ミリストイル基、パルミトイyl基、ステアロイル基、エイコサノイル基、ベヘノイル基、パルミトレイル基、オレオイル基、リノレオイル基、リノレノイル基およびアラキドニル基等が挙げられる。R₂はトリメチルアミノエチル基、アミノエチル基またはグリセリン基を示す。

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-59597

(43)公開日 平成7年(1995)3月7日

(51)Int.Cl.⁶

C 12 Q 1/34

識別記号

府内整理番号

F I

技術表示箇所

6807-4B

審査請求 未請求 請求項の数1 OL (全 6 頁)

(21)出願番号

特願平5-207824

(22)出願日

平成5年(1993)8月23日

(71)出願人 000131474

株式会社シノテスト

東京都千代田区神田神保町一丁目56番地

(72)発明者 三輪 国男

静岡県静岡市池田1087-10

(72)発明者 鈴木 康夫

静岡県静岡市瀬名200-16

(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

(54)【発明の名称】 血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ活性測定方法

(57)【要約】

【目的】 非放射性基質を用いる操作が安全、迅速、簡便、かつ高精度な血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼの直接測定法を提供する。

【構成】 PAF類縁体化合物を基質とし、これに試料中の血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼを作用させ、生成されるジカルボン酸を測ることにより、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ活性の測定を行う方法。

数が4から9の脂肪族ジカルボン酸基を示し、この脂肪族ジカルボン酸基は飽和または不飽和いずれでもよく、例えば、スクシニル基、グルタリル基、アジポイル基又はスペロイル基等が挙げられる。R₂はモノメチルアミノエチル基、ジメチルアミノエチル基又はトリメチルアミノエチル基を示す。

【0012】R₃はアシル基又はアルキル基を示し、特に炭素数が10から18の飽和若しくは不飽和のアシル基又はアルキル基が好ましく、例えば、アシル基としては、ラウロイル基、パルミトイル基、ステアロイル基又はオレオイル基等が、アルキル基としてはデシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、又はオクタデシル基等が挙げられる。

【0013】そして、一般式【I】で表されるPAF類縁体化合物の例としては、1-O-ヘキサデシル-2-スクシニル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1-O-ヘキサデシル-2-グルタリル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1-O-ヘキサデシル-2-スペロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1-O-オクタデシル-2-スクシニル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1-O-オクタデシル-2-グルタリル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1-O-オクタデシル-2-アジポイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1-O-オクタデシル-2-スペロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン又は1-O-ヘキサデカノイル-2-スクシニル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン等が挙げられる。

【0014】本発明における一般式【I】で表されるPAF類縁体化合物は、PAFアセチルヒドロラーゼにより加水分解され、一般式【I】のR₁に相当するジカルボン酸とリゾPAF又はリゾPAF類縁体化合物を生成する。この生成したジカルボン酸の生成速度又は生成量を測ることにより、PAFアセチルヒドロラーゼ活性を測定することが出来る。

【0015】これは生成したジカルボン酸に特異的に反応する酵素を作用させ、場合によっては更に連続する酵素反応系を組み合わせて、NAD⁺、NADP⁺、NADH、NADPH又は過酸化水素等の繊用されているマーカー物質を生成させる。そして、これらのマーカー物質を公知の方法により測定することにより、ジカルボン酸の生成速度又は生成量を求め、これよりPAFアセチルヒドロラーゼ活性値を得ることができる。

【0016】ジカルボン酸に特異的に反応する酵素としては、スクシニル-CoAシンテターゼ【GDP生成】(EC 6.2.1.4)、スクシニル-CoAシンテターゼ【ADP生成】(EC 6.2.1.5)、コハク酸デヒドロゲナーゼ(EC 1.3.99.1)、コハク酸

セミアルデヒドヒドロゲナーゼ(EC 1.2.1.1)、又はグルタリル-CoAシンテターゼ(EC 6.2.1.6)等が挙げられる。

【0017】NAD⁺、NADP⁺、NADH又はNADPHの測定は、340nmにおける吸光度の減少又は増加を測るか、電子伝達体とテトラゾリウム塩等の組み合わせによる発色を測定することにより行う。過酸化水素の測定は、パーオキシダーゼによりフェノール誘導体若しくはアニリン誘導体等と4-アミノアンチピリン等を縮合させて生成した色素を測定することにより行う。

【0018】本発明のPAFアセチルヒドロラーゼの活性測定方法における吸光度の測定は、エンド法でもレート法でも行うことができる。エンド法の場合には、まず本発明の一般式【I】で示される基質のみを除いた測定試薬と試料を反応させて、試料中に含まれる一般式

【I】のR₁に相当するジカルボン酸や測定反応系に影響を与える物質を除去しておく必要がある。

【0019】レート法の場合には、定量的に測定が行える時間内に吸光度の測定を行えば良い。なお、PAFアセチルヒドロラーゼの活性値の算出は、NADH、NADPH又は生成する色素等の分子吸光係数より行うか、一般式【I】のR₁に相当するジカルボン酸等を標準物質として用いることにより行う。

【0020】また、本発明のPAFアセチルヒドロラーゼの活性測定方法は、用手法でも自動分析装置を用いても行うことができる。例えば、本発明の一般式【I】のR₁がスクシニル基の基質を用いる場合には、PAFアセチルヒドロラーゼ活性を測りたい試料をこの基質に作用させ、生成してきたコハク酸を補酵素A(CoA)とグアノシン5'-三リン酸(GTP)の存在下スクシニル-CoAシンテターゼ(GDP生成)に作用させる。

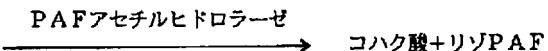
【0021】ここで生成したGDP(グアノシン5'-二リン酸)をホスホエノールピルビン酸とともにピルビン酸キナーゼに作用させる。そして、生じたピルビン酸をNADHの存在下乳酸脱水素酵素(LDH)に作用させると、NADHはNAD⁺に変化する。この時に、NADHの減少に伴ってNADHの吸収波長である340nmにおける吸光度も定量的に減少するので、340nmにおける吸光度の減少速度又は減少量よりNADHの減少速度又は減少量が算出される。

【0022】そして、このNADHの減少速度又は減少量はPAFアセチルヒドロラーゼによるコハク酸の生成速度又は生成量と一対一の対応をなすので、これより試料中のPAFアセチルヒドロラーゼの活性値を算出することができる。以上の反応系を図式化すると下記のようになる。

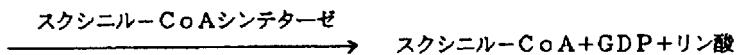
【0023】

【化3】

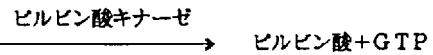
1. 一般式 [I] で表される PAF 類縁体化合物 (R_1 はスクシニル基) + H₂O



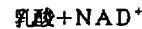
2. コハク酸 + CoA + GTP



3. GDP + ホスホエノールピルビン酸



4. ピルビン酸 + NADH + H⁺ $\xrightarrow{\text{LDH}}$



【0024】また、PAFアセチルヒドロラーゼ活性測定時には、キレート試薬を共存させることができが好ましい。キレート試薬を共存させることにより、Ca²⁺依存性のホスホリバーゼA₂活性による本発明のPAF類縁体化合物の分解反応を抑制することができ、PAFアセチルヒドロラーゼ活性を特異的に測定することができるようになる。このキレート試薬としては、EDTAあるいはEGTA等公知のものを使用することができる。

【0025】本発明のPAFアセチルヒドロラーゼ活性測定方法は、組織細胞型PAFアセチルヒドロラーゼを阻害することなく、組織細胞型PAFアセチルヒドロラーゼ活性、血清型PAFアセチルヒドロラーゼ活性及び総PAFアセチルヒドロラーゼ活性を正確に測定することができる方法である。なお、本測定方法においては、測定時に組織細胞型PAFアセチルヒドロラーゼ阻害物質を作らせることにより、血清型PAFアセチルヒドロラーゼと組織細胞型PAFアセチルヒドロラーゼとを分別定量することが可能となる。なお、組織細胞型PAFアセチルヒドロラーゼ阻害物質としては、トリプシン等のプロテアーゼやフッ化ナトリウム、ジイソプロピルフルオロリン酸又はジエチルピロカーボネート等が挙げられる。

【0026】PAFアセチルヒドロラーゼ活性を測定する試料としては、ヒト又は動物の血液、血清、血漿、尿若しくは羊水等の体液、そして、ヒト又は動物の細胞、臓器若しくは細胞及び臓器の抽出液等が対象となる。本発明におけるPAFアセチルヒドロラーゼの活性測定方法においては、一般式[I]で表されるPAF類縁体化合物の基質並びに生成されるジカルボン酸をマーカー物質に導きこれを測定するための酵素及び試薬は必須であるが、前記のキレート試薬又は組織細胞型PAFアセチルヒドロラーゼ阻害物質の他に、緩衝剤、安定化剤、活性化剤又は賦形剤等の酵素の活性測定に一般に用いられているものを使用しても良い。

【0027】そして、本発明におけるPAFアセチルヒドロラーゼの活性測定方法においては、活性測定時、一般式[I]で表されるPAF類縁体化合物の基質は0.01~1.0mMの濃度範囲で使用するのが好ましい。他の成分は反応系の至適濃度で使用すればよいが、例え

ば、GTPは0.01~5mM、CoAは0.01~5mM、スクシニル-CoAシンテターゼ等のジカルボン酸と反応する酵素は0.01~2.5U/1、ホスホエノールピルビン酸は1~50mM、ピルビン酸キナーゼは0.1~50U/1、NADHは0.01~1.0mM、LDHは0.1~1.0U/1及びキレート試薬は0.5~2.0mMの濃度範囲で使用するのが好ましい。また、緩衝剤はpH 6.5からpH 8.0の間に緩衝能を持つものならいずれも使用することができる。

【0028】なお、本発明の一般式[I]で表されるPAF類縁体化合物は、リゾPAFと無水ジカルボン酸を出発物質として、公知の合成方法により調製を行うことができる[A.Tokumura et al., Biochem.Biophys.Res.Commun., 155, 863-869(1988)]。例えば、50mgのリゾPAFと50mgの無水コハク酸を1mlのピリジン中、40℃で6時間加温し、反応終了後、調製用薄層クロマトグラフィープレート(Analtech silica gel G plate)で精製することにより、本発明の一般式[I]のR₁がスクシニル基のPAF類縁体化合物を調製することができる。

【0029】

【実施例】以下実施例により本発明をより具体的に詳述するが、本発明はこの実施例によって何等限定されるものではない。

PAFアセチルヒドロラーゼ活性の測定

【測定試薬】

①基質試薬

2.0mM 1-O-ヘキサデシル-2-スクシニル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン及び0.1%BSAを含む2.0M HEPES緩衝液(pH 7.5)。

②酵素試薬

0.5mM GTP、0.5mM CoA、2.5mM 塩化マグネシウム、13.5mM 塩化カリウム、7.8mM ホスホエノールピルビン酸、2.0mM NADH、スクシニル-CoAシンテターゼ(GDP生成)0.15U/1、ピルビン酸キナーゼ1U/1及びLDH 4U/1を含む0.3M HEPES緩衝液(pH 7.4)。

【試料】3種類の血清より調製した試料S1、S2及び

【操作】前記の酵素試薬1. 35 mlに試料200 μlを添加し、攪拌した後37°Cで5分間インキュベーション（加温）し、その後基質試薬0.45 mlを添加して攪拌した後、37°C恒温装置を備えた分光光度計を用いて、5分間1分毎に340 nmにおける吸光度を測定した。なお、試料のかわりに精製水を添加したものと対照とした。

【0030】この測定操作は、3種類の試料それぞれについて3回ずつおこない、3回の1分間当たりの吸光度変化量の平均を測定値とした。反応が定量的に進行していた2分目から3分目にかけての単位時間（1分間）当たりの吸光度の変化量（ΔA b s.）とNADHの分子吸光係数ε=6500から各試料のPAFアセチルヒドロラーゼ活性値を算出した。

【0031】その結果は、S1=1.23 (nmol/min/試料50 μl)、S2=1.03 (nmol/min/試料50 μl)、S3=0.64 (nmol/min/試料50 μl) であった。前記の試料のPAFアセチルヒドロラーゼ活性を測定した時のタイムコースを図1に示した。

【0032】横軸は基質試薬を添加した後のインキュベーション時間、縦軸は基質試薬を添加した時の340 nmにおける吸光度を0とした場合の吸光度の減少量を示す。なお、340 nmにおける吸光度の減少量、即ちNADHの減少量は、PAFアセチルヒドロラーゼにより生成されるコハク酸の生成量、即ちPAFアセチルヒドロラーゼ活性と一対一の対応をなしている。

【0033】この図より、インキュベーション初期には、試料中のPAFアセチルヒドロラーゼにより生成されるコハク酸が反応時間に比例して定量的に増加していることが示されている。よって、本発明のPAFアセチルヒドロラーゼ活性測定方法においては、測定反応が定

量的に進行することが確かめられた。

【0034】また、本発明の測定方法と従来のチオPAFを基質として用いるPAFアセチルヒドロラーゼ活性測定方法との相関を図2に示した。チオPAFを基質として用いる測定方法(Y)と本測定方法(X)との相関は、回帰式： $Y = 1.462X + 0.237$ 、相関係数： $r = 0.9997$ と良い相関を示し、本測定方法は充分実用性があることが実証された。

【0035】なお、従来のチオPAFを基質として用いるPAFアセチルヒドロラーゼ活性測定方法の操作は、特開平4-346797号公報の記載に従って行った。

【0036】

【発明の効果】本発明によるPAFアセチルヒドロラーゼ活性測定方法は、試料中のPAFアセチルヒドロラーゼ活性を放射性標識基質を用いることなく直接測定することが可能となるので、日常の検査に安全、迅速、簡便かつ高精度の測定方法として充分利用できる。

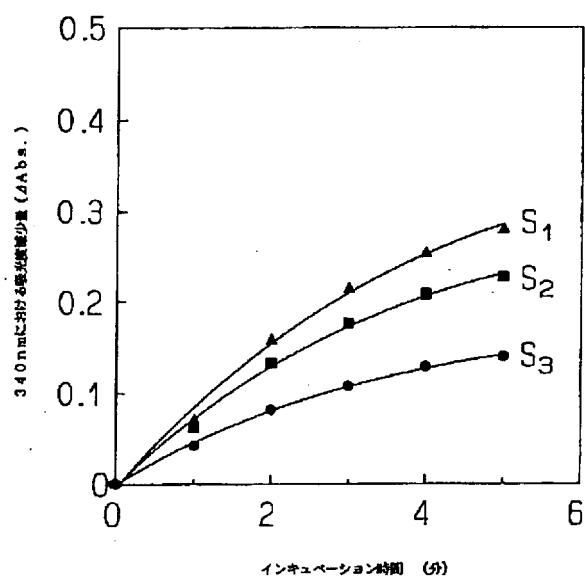
【0037】また、従来の方法より測定時間が短縮されたことにより疾患の検定、予後の経過を短時間で診断できるため有用性が高い。さらに、本発明のPAFアセチルヒドロラーゼ活性測定方法は、組織細胞型PAFアセチルヒドロラーゼを阻害することなく、組織細胞型PAFアセチルヒドロラーゼ活性、血清型PAFアセチルヒドロラーゼ活性及び総PAFアセチルヒドロラーゼ活性を正確に測定することができる方法であり、各種炎症疾患の病態の診断にとって有用な方法である。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の測定方法により試料中のPAFアセチルヒドロラーゼ活性を測定した時のタイムコースを示した図である。

【図2】本発明の測定方法とチオPAFを基質として用いる測定方法との相関を示した図である。

【図1】



【図2】

